

University of Groningen

B lymphocyte development in rat bone marrow

Hermans, Maria Hendrika Anna

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1991

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Hermans, M. H. A. (1991). *B lymphocyte development in rat bone marrow*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

In beenmerg worden continu B lymphocyten gegenereerd door proliferatie en differentiatie van pluripotente hemopoietische stamcellen. De differentiatie van B lymphocyten gaat gepaard met differentiele expressie van een aantal genen. Met behulp van antilichamen specifiek voor de gen-producten van deze genen kunnen zo diverse stadia van differentiatie fenotypisch worden gekarakteriseerd. Bestaande merkers zijn de immuunglobuline gen producten, het enzym "terminal deoxynucleotidyl transferase" (TdT) en het "leukocyte common antigen" (L-CA). Zoals beschreven in de hoofdstukken 2 en 3 heb ik gezocht naar additionele merkers om meer stadia van B-lymphocytopoiese te kunnen definiëren. Hiervoor heb ik monoclonale antistoffen (Mab) tegen rat beenmerg cellen geproduceerd. Een van de verschillende Mab welke ik verkreeg was HIS50 dat een molecuul herkent dat aanwezig is op de meerderheid van de B lymfoïede cellen, zowel in beenmerg als in de perifere lymfoïede organen. Biochemische karakterisatie van het HIS50 antigeen liet zien dat het gedeeltelijk verwijderd kon worden van de celmembraan door behandeling met "phosphatidylinositol-phospholipase-C", hetgeen aangeeft dat tenminste een gedeelte van de moleculen verankerd zit in de celmembraan via een "glycophosphatidylinositol" deel. Ik heb de HIS50 antigeen distributie geanalyseerd binnen subpopulaties van B-lymfoïede cellen in beenmerg die gedefinieerd zijn door Thy-1, L-CA, TdT, μ zware keten en κ lichte keten. Het HIS50 antigeen bleek tot expressie te worden gebracht door een gedeelte van de L-CA⁺TdT⁺ Ig⁻ and TdT⁺ cel populaties, en door alle μ^+ pre-B and B cellen. De toevoeging van HIS50 Mab aan de bestaande merkers liet de detectie toe van een subpopulatie van vrij grote, waarschijnlijk B lymfoïede cellen (L-CA⁺ HIS50 TdT⁺ Ig⁻ cellen) die 1,6% van de beenmerg kernhoudende cellen vormen. In Hoofdstuk 2 stel ik een model van B-lymfocytopoiese voor in rattebeenmerg waarbij ik tevens rekening houd met bestaande functionele, fenotypische, genotypische en kinetische data.

Andere Mab die uit dezelfde fusie kwamen en beenmerg subpopulaties identificeerden waren HIS49 dat een molecuul herkent dat aanwezig is op erythroïede cellen, HIS43 dat een molecuul op sinusendoteel en stromale elementen in beenmerg herkent, en HIS51 dat het Thy-1 molecuul herkent. Deze Mab werden gebruikt in topografische studies van beenmerg (Hoofdstukken 3 t/m 5).

Om het micromilieau van B lymfocytopoiese te onderzoeken heb ik een methode ontwikkeld om cryo-coupees van botjes van muizen en ratten te snijden, en om die vervolgens te kleuren mbv. (dubbel) immuunfluorescentie en immuunperoxidase. Hoofdstuk 3 rapporteert het gebruik van deze methode bij het bestuderen van de expressie van een aantal antigenen door hemopoietische cel subpopulaties. Ik laat de locatie zien van hemopoietische voorlopercellen (Thy-1), en myeloïede cellen (Mac-1) in muizebeenmerg, en vroege hemopoietische voorlopers en lymfoïede cellen in rattebeenmerg. In muizebeenmerg zijn nieuwe bevindingen: (i) de verspreide locatie van vroege hemopoietische voorlopers over het gehele merg, en (ii) de aanwezigheid van Thy-1⁺ stromale cellen, hoofdzakelijk subendosteaal. In rattebeenmerg een belangrijke vondst is die van een subendosteaal gebied, van ongeveer 12 tot 14 hemopoietische cellagen dik dat gekarakteriseerd wordt door hoge dichtheid van Thy-1, en de afwezigheid van erythroïede cellen. Dubbel-immuunfluorescentie voor merkers die tot expressie worden gebracht door erythroïede cellen en macrofagen liet zien dat erythroïede cellen vaak in grote groepen voorkomen, in de directe omgeving van individuele macrofagen. Macrofagen waren uniform gedistribueerd over het merg.

Deze studie laat duidelijk een tweedeling van het merg zien: een subendosteaal gebied en een centraal merg gebied.

Vervolgens heb ik de distributie van verschillende B lymfoïede subpopulaties, gedefinieerd door TdT, μ en κ , in beenmerg onderzocht. Daarbij kwam ik een vergelijkbare tweedeling van beenmerg gebieden tegen als die voor Thy-1. Zowel TdT⁺ cellen als pre-B cellen kwamen subendosteaal in hogere frequentie voor dan centraal, terwijl B lymfocyten over het gehele merg gedistribueerd waren, gedeeltelijk in de beenmerg sinussen. In deze studie kwam ik groepen van TdT⁺ cellen en pre-B cellen tegen. Met het idee dat zulke groepen afstammeling cellen van een enkele oudercel zouden kunnen zijn heb ik de groepering van de cellen mathematisch geanalyseerd, waarbij ik enkele (kleine) afwijkingen van "random" verdelingen vond. Vervolgens heb ik chimere ratten geconstrueerd om met een meer directe aanpak de clonale samenstelling van deze groepen cellen vast te stellen (hoofdstuk 5). Ik heb foetale levercellen i.p. ingespoten in niet bestraalde pasgeboren ratjes. RT7 (CD45, L-CA) fungeerde als merker-systeem om twee congene rattendammen van elkaar te onderscheiden. In deze chimeren, lagen de donor afkomstige cellen verspreid tussen de gastheer/vrouw cellen, en ik vond geen aanwijzing voor clonale oorsprong van de groepen TdT⁺, pre-B of B cellen. Dit betekent dat de mathematisch afgeleide afwijkingen van random groepering in hoofdstuk 4 hun oorsprong hebben in andere oorzaken dan groepering van cellen die van een oudercel afkomstig zijn.

Vervolgens heb ik diezelfde chimere dieren gebruikt voor een analyse van de klonale opbouw van het lymfoïede systeem (Hoofdstuk 5). Analyse van de donor afkomstige cellen *in situ* liet zien dat (i) in jong adulte ratten, zowel de vroege B als T lymfocyt vorming zeer polyclonaal is, dat wil zeggen dat veel hemopoietische stamcellen en prothymocyten en/of intrathymale stamcellen bijdragen aan de productie van lymfocyten op een bepaald tijdstip, en (ii) zowel in de thymus als in beenmerg blijken afstammelingen van oudercellen zich snel te verspreiden.

Daarnaast bleken er in de thymus verschillen te zijn in donorcel proportie tussen verschillende lobuli. Een mathematische analyse van deze verschillen gaf ongeveer 17 tot 18 celdelingen aan in de cortex van de thymus.

In de milt, 5 dagen na antigene stimulatie met schape rode bloed cellen, bleken de kiemcentra oligoklonaal tot ontwikkeling te zijn gekomen.